

AIDE – MEMOIRE du « petit chimiste mycophile » !

Marcel Lecomte

<p>Conventions :</p> <ul style="list-style-type: none"> • lorsque nous parlons d'un produit à x %, cela signifie qu'il s'agit d'une solution aqueuse, réalisée dans l'eau bidistillée • lorsque nous parlons d'eau, il s'agit toujours d'eau bidistillée • Les objets colorés qui doivent être lavés, le sont dans le solvant du colorant 	
acide acétique	à 2 ou 5 %, est utilisé comme ramollisseur pour des espèces un peu coriaces
acide chlorhydrique	à 3 ou 5 %, il permet de régresser les coupes colorées à la fuchsine de Ziehl
acide sulfurique	à 50 ou 80 %, est utilisé pour les réactions sulfoaldéhydiques (vanilline, benzaldéhyde)
acide nitrique + aniline	ces 2 produits permettent de réaliser la réaction de Schaeffer sur la cuticule des agarics
alcool (éthanol ou méthanol)	<ul style="list-style-type: none"> • eau et alcool ne font pas bon ménage ! • un colorant en solution alcoolique se lave à l'alcool ; un colorant en solution aqueuse se lave à l'eau. • il est très hygroscopique (avide d'eau) : il contracte fortement les cellules (le 1/2 de leur volume) et rigidifie les tissus
ammoniaque (NH ₄ OH)	<ul style="list-style-type: none"> • concentrée, elle a le pouvoir de regonfler les exsiccata ou de ramollir les hyphes de champignons frais • elle met en évidence les chrysocystides chez certains genres (<i>Stropharia</i>, <i>Hypholoma</i>...)
ammoniaque 50 %	laver les préparations montées dans le rouge Congo ammoniacal, avant de réaliser des photos
Aquatex	milieu de montage définitif pour pièces fragiles, qui polymérise rapidement mais dont le solvant est l'eau → indispensable en mycologie
baume du Canada	résine de confère qui permet de conserver définitivement des préparations microscopiques → très gros inconvénient en mycologie : il nécessite une déshydratation complète, ce qui « ratatine » les éléments fragiles
benzaldéhyde	mélangé extemporanément avec de l'acide sulfurique 80 %, il noircit les piléocystides de certaines russules (on parlera alors de SBA+)
bleu coton lactique ou lactophénolé	<ul style="list-style-type: none"> • laver les préparations montées dans le bleu lactique, avec du lactophénol • mettre en évidence l'ornementation sporale des Ascomycètes
bleu de crésyl	excellent colorant, encore trop souvent délaissé par les mycologues ; donne d'excellents résultats pour la métachromatie
bleu de méthylène	colorant basique, ou nucléaire ; basophilie et cyanophilie sont synonymes
bleu de toluidine	excellent colorant, trop souvent délaissé par les mycologues
carmin acétique	<ul style="list-style-type: none"> • permet de mettre en évidence la sidérophilie des cystides chez les <i>Lyophyllum</i> notamment • est utilisé pour l'observation des noyaux et le comptage des chromosomes, qui sont fortement mais finement colorés.
chloral-lactophénol	permet de déshydrater les tissus aqueux en quelques minutes, sans contraction ni retrait.
éosine	<ul style="list-style-type: none"> • colorant acide ; acidophilie et éosinophilie sont synonymes • colorant plasmatique : elle colore le contenu de la cellule
formol (ou formaldéhyde)	<ul style="list-style-type: none"> • c'est un bon fixateur, mais qui durcit fortement les tissus • le formol commercial est assez impur (il contient de l'acide formique et du méthanol) et très acide (il doit être neutralisé avant emploi avec du carbonate de calcium par exemple). Il nous paraît plus indiqué d'utiliser du formol de laboratoire • la fixation par le formol renforce nettement les affinités basophiles
fuchsine de Ziehl	colore en violet foncé les incrustations acido-résistantes des hyphes primordiales de la cuticule de certaines russules

Giemsa	coloration des noyaux des hyphes du mycélium (technique assez lourde - voir H.G. Cléménçon)
glycérine	présente dans nombre de liquides d'observation, elle évite le dessèchement et améliore l'indice de réfraction optique
glycérine gélatinée	elle permet la conservation de préparations (préparations semi-définitives) et peut être colorée dans la masse
hypochlorite de soude (eau de Javel)	<ul style="list-style-type: none"> • elle permet de blanchir les coupes. L'eau de Javel est un dérivé impur de l'hypochlorite de soude, et est peu conseillée en microscopie. • ce produit a la propriété de dissoudre complètement le contenu des cellules (pratiquement, on l'utilise surtout en histologie végétale lorsqu'on souhaite ne garder que les parois des tissus) • à 50 %, il jaunit la cuticule des agarics de la section des <i>Xanthodermatei</i>
lactochloral	permet de déshydrater les tissus aqueux en quelques minutes, sans contraction ni retrait
lactoglycérol	Fortement recommandé par H. Cléménçon pour remplacer le chloral-lactophénol ou le lactophénol qui sont tous deux toxiques et corrosifs
Iugol fort de Nicolle	une ligne tracée sur l'hyménophore permet de vérifier directement si les spores sont amyloïdes
papier tournesol	<ul style="list-style-type: none"> • permet de déterminer la nature acide ou basique d'un milieu liquide (le neutre se situe à un pH de 7) • plus on tend vers 1, plus le milieu est acide : le papier est de + en + rouge • plus on tend vers 14-15, plus le milieu est basique : le papier est de + en + bleu
phloxine	colorant acide, plasmatique de la cellule
potasse (K) = hydroxyde de potassium (KOH)	<ul style="list-style-type: none"> • à 2 ou 5 % (selon la fragilité du matériel traité), elle regonfle les exsiccata ; à 10 %, on l'utilisera pour dissocier les « croûtes » et les polypores • compatible avec le rouge Congo ammoniacal • incompatible avec le rouge Congo SDS (formation d'un précipité) • à 20 % et à chaud, elle permet de regonfler les Polyporacées
ramollisseur de Cléménçon	ne s'utilise qu'avec le rouge Congo ammoniacal
ramollisseur GSD de Cléménçon	ne s'utilise qu'avec le rouge Congo SDS
regonflage des exsiccata	on peut utiliser notamment des alcalis (ammoniacque, potasse, soude) ou le lactophénol, le chloral-lactophénol, le lacto-chloral, l'acide lactique, l'hydrate de chloral, l'eau acétique à 50%.
rouge Congo	colorant les parois des cellules (boucles, hyphes, cystides, basides) → révélateur des milieux acides : il devient alors tout noir
rouge Congo ammoniacal	<ul style="list-style-type: none"> • excellent liquide d'observation pour des exsiccata ; ne pas laver les préparations à l'eau (qui provoque une cristallisation) mais à l'ammoniacque à 50 % • utilisable sur du matériel frais si on veut examiner les hyphes qui sont ramollies par l'ammoniacque
rouge Congo SDS	excellent liquide de première observation, conseillé sur du matériel frais
SDS = Sodium Dodécyl Sulfate	c'est un agent mouillant stable, un détergent industriel, qui facilite nettement la coloration ; on peut le remplacer avec un certain succès, par un bon détergent de vaisselle. Nous l'ajoutons au rouge Congo aqueux, au bleu de toluidine
soude (Na) = hydroxyde de sodium (NaOH)	elle a les mêmes propriétés que la potasse, MAIS est compatible avec le rouge Congo SDS
sulfovanilline	étude des cystides des russules et des lactaires ; mise en évidence des laticifères

Littérature consultée :

- CLEMENCON H., 2009 – *Methods for working with Macrofungi, Laboratory Cultivation and Preparation of Larger Fungi for Light Microscopy*, IHW-Verlag, 88 p.

Guttules, vacuoles et noyaux

Marcel Lecomte

Lors de préparations microscopiques, nous sommes confrontés souvent à des nécessités d'interprétation des éléments observés : ces grandes formes géométriques que nous observons (ici, à l'intérieur des ascospores), que sont-elles ? Guttules, vacuoles ou noyaux ?



Geopora arenicola – photo M. Lecomte

Des définitions d'abord :

Le noyau : en biologie, c'est un organite, présent dans la majorité des cellules, et contenant la plupart du matériel génétique de la cellule. Il a deux fonctions principales : contrôler les réactions chimiques du cytoplasme et stocker les informations nécessaires à la division cellulaire. Il a un diamètre moyen de 5 à 7 μm .

La vacuole est un organite présent dans les cellules végétales et fongiques. Elle est délimitée par une membrane ; remplie d'eau, elle contient diverses molécules dont des enzymes. Elle n'a pas de forme ou de taille particulière, sa structure variant en fonction des besoins de la cellule.

Ses fonctions générales sont :

- L'isolement de composants potentiellement nocifs pour la cellule.
- La gestion des déchets à l'aide d'enzymes de digestion, ou l'endocytose d'éléments vieillissants du cytoplasme.
- Le maintien de l'équilibre en eau.
- Le stockage permanent ou transitoire de l'eau et de molécules telles que certains pigments, des glucides, protéines et lipides.

Une guttule est une inclusion ovoïde à sphérique, de nature lipidique (graisseuse), se trouvant dans le cytoplasme de certaines cellules fongiques, et plus particulièrement dans les spores, les paraphyses, parfois dans les hyphes, basides et les cystides. On en trouve aussi dans les levures.

Dans une situation d'observation normale d'éléments fongiques placés dans de l'eau, avec un microscope à lumière incidente ou réfléchi, il est généralement impossible d'observer les noyaux des cellules. Leur mise en évidence nécessite des techniques de coloration particulières et assez lourdes.

Les GUTTULES

Afin de les différencier avec certitude, nous allons utiliser le **rouge Soudan au bleu coton lactique** ou **lactophénol**, ou le **rouge huile O** : ce sont des colorants qui mettent en évidence la présence de résidus ou d'éléments lipidiques. R. Kühner utilise le **bleu de crésyl** pour colorer en jaune doré caractéristique les lipides libres (enclaves ou exsudats).

Elles s'avèrent très importantes pour la différenciation de certains Ascomycètes.

Les VACUOLES

A nos yeux, le moyen le plus simple pour les identifier avec certitude est de **provoquer leur contraction** ; pour cela, placer les éléments à observer dans une goutte d'une solution aqueuse à 10 ou 15 % de chlorure de Na (sel de cuisine), de saccharose (sucre blanc) ou de glycérine.

Le bleu de crésyl s'utilise en solution aqueuse largement diluée ; il permet alors une coloration uniforme des vacuoles, ou la mise en évidence de granulations fortement teintées.